

一株淡剑灰翅夜蛾病原性真菌莱氏绿僵菌的多基因序列鉴定

罗卿权¹ 路广亮¹ 徐颖^{1*} 李丽² 王凤¹

(1. 上海市园林科学规划研究院, 上海 200232; 2. 上海辰山植物园, 上海 201602)

摘要: 为明确从草坪害虫淡剑灰翅夜蛾 *Spodoptera depravata* (Butler) 罹病虫体分离得到的病原性真菌菌株 DT2011N7 的分类地位, 通过形态学观察、BLAST 序列比对以及基于 ITS、 β -tubulin 和 *rpb2a* 的单基因序列分析和 3 个基因联合的多基因序列分析对菌株进行了鉴定。结果显示, 菌株 DT2011N7 在萨氏麦芽糖酵母浸粉培养基上培养时, 菌落初期呈白色, 产孢后表面密布孢子呈淡绿色; 分生孢子为椭圆形, 大小为 $3.5\sim 5.5\ \mu\text{m}\times 2.0\sim 2.8\ \mu\text{m}$ 。BLAST 序列比对结果显示菌株 DT2011N7 与莱氏绿僵菌 *Metarhizium rileyi* 一致性最高, 达 99%~100%; 在 3 个单基因及多基因系统进化树中, 该菌株均与莱氏绿僵菌聚在同一进化分支中, 自展值达 99~100。结合形态学特征、同源性比对结果及系统进化树分析, 将菌株 DT2011N7 鉴定为莱氏绿僵菌 *M. rileyi*。

关键词: 莱氏绿僵菌; 系统进化树; 单基因; 多基因

Identification of pathogenic fungus *Metarhizium rileyi* isolated from lawn grass cutworm *Spodoptera depravata* based on multiple-gene sequence analysis

Luo Qingquan¹ Lu Guangliang¹ Xu Ying^{1*} Li Li² Wang Feng¹

(1. Shanghai Academy of Landscape Architecture Science and Planning, Shanghai 200232, China;

2. Shanghai Chenshan Botanic Garden, Shanghai 201602, China)

Abstract: In order to identify the pathogenic fungal strain DT2011N7, which was isolated from the diseased larvae of lawn pest *Spodoptera depravata* (Butler), morphological method, BLAST, and molecular phylogenetic analysis method were used based on individual and concatenated ITS, β -tubulin and *rpb2a* gene fragments. The colony on SMAY medium was white at the early stage and then turned light green due to being covered with spores. Conidia were typically ellipsoidal with the size of $3.5\sim 5.5\ \mu\text{m}\times 2.0\sim 2.8\ \mu\text{m}$. BLAST in NCBI indicated that the strain DT2011N7 had 99% – 100% similarity with *Metarhizium rileyi*, and phylogenetic analyses indicated that the strain DT2011N7 was always grouped in the same clade as *M. rileyi* with a bootstrap value of 99–100. Based on the morphological characters, BLAST and phylogenetic analysis, the strain DT2011N7 was identified as *M. rileyi*.

Key words: *Metarhizium rileyi*; phylogenetic tree; single-gene; multi-gene

昆虫病原真菌是一类能感染昆虫并在其体表或体内增殖, 使昆虫发病甚至死亡的真菌。这类真菌能够开发为使用方便的微生物制剂, 具有对人类、环境和非靶标生物安全且不易产生抗药性等优点, 近

年来发展十分迅速。de Faria & Wraight(2007)指出, 自 1888 年首次尝试用真菌防治害虫以来, 全球至少有以绿僵菌属 *Metarhizium* 和白僵菌属 *Beauveria* 真菌为主的 12 个种或亚种真菌被应用于防控半翅目、鞘

基金项目: 上海市科技人才计划项目(14YF1414100), 上海市绿化和市容管理局攻关项目辰山科研专项(G142437)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: xuying20002@163.com

收稿日期: 2016-11-10

翅目、鳞翅目、缨翅目和直翅目的48科昆虫。我国自20世纪90年代起,白僵菌被广泛用于防治以松毛虫为主的食叶害虫,每年施用白僵菌防治森林害虫的面积在50万 hm^2 左右(宋玉双和黄北英,2006);截至2014年7月,全球有83个绿僵菌产品获得注册,防治对象分属12目33科(农向群等,2015)。利用昆虫病原真菌防治害虫已成为有害生物防治的重要手段(Li et al.,2010)。

淡剑灰翅夜蛾 *Spodoptera depravata* (Butler) 又名淡剑袭夜蛾,是近年来为害多种禾本科草坪草的重要鳞翅目害虫,在日本、韩国均有分布(Iwano, 1987; Kang et al.,2004)。该虫是我国东部地区发生最为严重的草坪害虫,虫口密度高时,每平方米可达数百头,在上海(顾保龙等,2007)、江苏、湖北、湖南、浙江、福建(陈一心,1999)、河北(严彩霞等,1999)、辽宁(王润珍等,2007)、安徽(周明善等,2000)、天津(郭佩联等,1993)和山东(薛明等,2002)等省市均有报道。由于其产卵量大、世代重叠严重,化学防治难度较大,且目前该虫的防控多依靠有机磷农药,并不适宜在人们休闲休憩的草坪上使用,因此探寻安全高效的淡剑灰翅夜蛾生物防治技术尤为重要。

莱氏绿僵菌 *Metarhizium rileyi* 又名莱氏野村菌 *Nomuraea rileyi*,是一种极具潜力的防治鳞翅目幼虫的虫生真菌,在一定环境条件下能引起害虫的病害流行,有效降低害虫种群数量(涂增,2006; Perinotto et al.,2012)。Srisukchayakul et al.(2005)研究结果显示,莱氏绿僵菌在斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 上完成1个发育周期仅需8~9 d。Ambethgar(2009)认为,莱氏绿僵菌与不同的杀虫剂配合使用,有助于斜纹夜蛾和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的防治,延缓抗药性产生。该菌对斜纹夜蛾、棉铃虫、小菜蛾 *Plutella xylostella* 等30多种昆虫(鳞翅目害虫为主)有较强的致病力(Ignoffo et al.,1976; Perinotto et al.,2012)。迄今为止,国内未见莱氏绿僵菌感染草坪害虫淡剑灰翅夜蛾的报道。

目前,多以传统的形态学特征结合分子生物学技术如rDNA-ITS序列分析对莱氏绿僵菌进行分类鉴定(吕思行等,2015;钟万芳等,2015)。然而,ITS序列提供的遗传信息有限,有时并不能有效区分关键进化节点(Moriwaki et al.,2002; Bischoff et al.,2006)。近年来逐渐广泛应用的多基因序列联合分析技术极大地提高了微生物系统进化分析及种类鉴定的准确性(Bischoff et al.,2006)。Weir et al.(2012)基于ITS、*GAPDH*、*CAL*、*ACT*、*CHS*多基因联合分

析,对胶孢炭疽菌复合体 *Colletotrichum gloeosporioides* complex进行了系统进化分析;王萌等(2014)采用*efl- α* 、*rpb1*、*rpb2*、 *β -tubulin*基因联合对10株绿僵菌菌株的分类地位进行了系统进化分析。本课题组前期调查发现,在秋季上海市局部地区草坪上淡剑灰翅夜蛾受真菌侵染,发生病害流行且大量死亡的现象。本研究从野外采集淡剑灰翅夜蛾罹病虫体进行病原菌分离,结合形态学特征、单基因及多基因序列分析对其中1株菌株进行分子鉴定,并以Kepler et al.(2014)多基因系统进化树为佐证,明确该菌株的分类地位,以期对草坪重要害虫淡剑灰翅夜蛾的生物防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:菌株DT2011N7分离自上海辰山植物园采集的罹病淡剑灰翅夜蛾虫体。接种环蘸取少量罹病虫体体表孢子,采用平板划线分离法于含0.3%乳酸的PDA平板进行病原菌分离,26℃恒温培养3~5 d,挑取单菌落,4℃冰箱保存备用。

供试昆虫:野外采集淡剑灰翅夜蛾虫卵,自然孵化后将幼虫转移至养虫盒,放置于光周期L:D=14 h:10 h、相对湿度75%、温度26℃的光照培养箱中,以高羊茅 *Festuca elata* 为饲料人工饲养,至成虫羽化后交尾产卵,取下一代3~4龄幼虫为供试虫体。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:去皮马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂粉16 g,加蒸馏水定容至1 000 mL;萨氏麦芽糖酵母浸粉(Sabouraud maltose agar with yeast extract, SMAY)培养基:麦芽糖提取物40 g、蛋白胨10 g、酵母粉10 g、琼脂粉16 g,加蒸馏水定容至1 000 mL。

试剂:DNA凝胶回收试剂盒,Axygen生物技术有限公司;10×PCR Buffer、dNTP Mix、 MgCl_2 、*rTaq*、pMD19-T Vector,宝生物工程(大连)有限公司;其余试剂均为分析纯。

仪器:Leica DM LS2光学显微镜、Leica DFC 450摄像头,德国徕卡显微系统有限公司;MLR-350光照恒温培养箱,日本三洋公司;Biorad Gel Doc™ XR+凝胶成像系统,美国伯乐公司;Biometra T-professional PCR仪,德国耶拿公司。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的回接试验及形态学观察

将4℃冰箱保存的菌株DT2011N7于SMAY平板上26℃恒温培养7~10 d,产孢待用。用0.05%吐

温 80 无菌水洗脱孢子,制备成浓度为 1×10^8 个/mL 的孢子悬浮液。取同一批次淡剑灰翅夜蛾 3~4 龄幼虫 10 头,采用孢子悬浮液浸渍法回接,浸渍试虫 15 s 后,转移至养虫盒,于光周期 L:D = 14:10、温度 26℃ 恒温保湿培养。试虫患病死亡后,对罹病虫体再次进行分离,以验证回收得到的致病菌是否与 DT2011N7 形态一致。将菌株 DT2011N7 转接至 SMAY 平板上于 26℃ 恒温培养 5 d 后,通过肉眼观察菌落特征;7~10 d 产孢后制备临时玻片,在光学显微镜下观察菌丝及孢子形态特征并拍摄分生孢子照片,选取不同大小分生孢子 100 个,测量分生孢子长和宽。

1.2.2 病原菌目的基因的扩增及测序

用 L 型玻棒蘸取菌株 DT2011N7 孢子悬浮液,均匀涂布于 SMAY 平板,26℃ 恒温培养 5~7 d 至菌丝长满平板。参照罗卿权等(2012)的平板刮取菌丝法:在 SMAY 平板上倒入液氮,用灭菌载玻片刮取平板表面菌丝,转移至研钵,加入少量灭菌石英砂,研磨菌丝至细粉状,依据改良的 CTAB 法提取 DNA (Nicholson & Parry, 1996)。

采用真菌通用引物 ITS1/ITS4 (White et al., 1990) 扩增 ITS 序列。25 μ L PCR 反应体系:10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L、25 mmol/L dNTP Mix 2 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L、20 μ mol/L 引物 ITS1 和 ITS4 各 0.5 μ L、50 ng/ μ L DNA 模板 0.5 μ L、5 U/ μ L *rTaq* 0.125 μ L。反应程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 15 s,50℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 45 s,35 个循环;72℃ 延伸 5 min。

用于多基因系统发育树构建的目的基因还包括 *β -tubulin* 和 *rpb2a*, 相应引物 T1/T22、fRPB2-5F/RPB2-7cR 设计及 PCR 反应条件参照 Bischoff et al. (2009) 进行。扩增后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测

PCR 产物,并用 DNA 凝胶回收试剂盒切胶纯化,纯化后的 DNA 片段通过 pMD19-T Vector 载体转入到 JM109 大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞中进行克隆,蓝白斑筛选后获得阳性单克隆。将单克隆送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.3 序列比对及系统进化树构建

将 ITS、 *β -tubulin* 和 *rpb2a* 基因片段的测序结果提交至 GenBank,并在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对。从 GenBank 下载莱氏绿僵菌及近缘绿僵菌属多个种菌株的 ITS、 *β -tubulin*、*rpb2a* 序列,结合所得测序结果,以球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 为外群,用 Mega 7.0 软件进行序列比对,序列两端截齐后使用最大似然法(maximum likelihood, ML)分别构建单基因及多基因系统进化树,Bootstrap 值设为 1 000。使用 Sequence Matrix 1.80 软件依次连接两端截齐后的 ITS、 *β -tubulin*、*rpb2a* 基因片段即得到多基因联合序列。

2 结果与分析

2.1 病原菌的回接试验及形态学特征

经菌株 DT2011N7 孢子悬浮液浸渍后,3~8 d 淡剑灰翅夜蛾试虫即受侵染死亡,体僵硬,表面密布白色菌丝,后期表面密布淡绿色孢子;从罹病虫体分离获得的菌株与保存菌株形态一致,表明菌株 DT2011N7 为淡剑灰翅夜蛾致病病原菌。菌株 DT2011N7 在 SMAY 培养基上培养 5 d 后,菌落早期为白色,产孢后菌丝上密布淡绿色孢子(图 1-a)。菌丝光滑有分隔,分生孢子梗呈穗状,每个分枝上有数个瓶梗,瓶梗短圆柱形,近基部略膨大,顶部短尖。分生孢子着生于顶部短尖处(图 1-b),多为椭圆形,光滑,大小为 $3.5 \sim 5.5 \mu\text{m} \times 2.0 \sim 2.8 \mu\text{m}$ 。

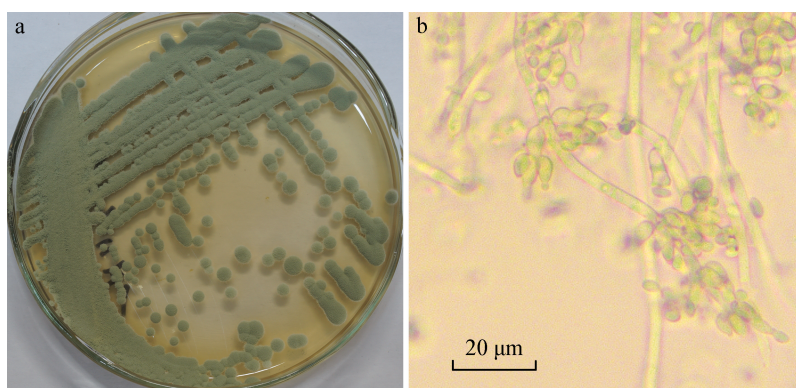


图 1 菌株 DT2011N7 的形态特征

Fig. 1 Morphological characters of strain DT2011N7

a: 菌落形态; b: 分生孢子梗及分生孢子。a: Colony morphology; b: conidiophores and conidia.

2.2 序列比对及系统进化分析

2.2.1 测序及序列比对

测序获得菌株DT2011N7长度为619 bp的ITS序列、1 472 bp的 β -tubulin序列和995 bp的rpb2a序列。将3条序列提交GenBank数据库,获取登录号依次为KX641194、KX641195和KX641198,BLAST比对结果显示菌株DT2011N7的ITS序列与莱氏绿僵菌一致性达99%,与黄绿绿僵菌*M. flavoviride*和厚垣普奇尼亚菌*Pochonia chlamydosporia*的ITS序列一致性达89%~91%;其 β -tubulin序列与莱氏绿僵菌一致性达99%,与黄绿绿僵菌等其它绿僵属菌株的 β -tubulin序列一致性多在80%~85%之间;序列rpb2a与莱氏绿僵菌一致性达99%~100%,与蝗绿僵菌*M. acridum*等的rpb2a序列一致性多在95%~91%之间。表明菌株DT2011N7的3个基因序列均与莱氏绿僵菌的同源性最高,一致性达99%~100%。

2.2.2 单基因系统进化树构建及分析

基于ITS(图2)、 β -tubulin(图3)和rpb2a(图4)序列分别构建了菌株DT2011N7的单基因ML系统进化树,聚类结果较为一致,均与莱氏绿僵菌聚集于同一个分支,自展值为99~100,表明菌株DT2011N7与莱氏绿僵菌遗传距离最近。在3个单基因系统进化树中,绿僵菌属内同一种类不同菌株的序列均能聚集于同一分支,自展值多为90以上,表示系统进

化树中对种的聚类较为可信。但基于ITS和rpb2a序列的单基因ML系统进化树中,不同种的很多上级分支节点的自展值不高,聚类可信度相对较低。尤其在基于ITS序列的单基因ML系统进化树中,许多分支自展值低于40,不够准确,表明仅靠ITS序列无法准确鉴定。基于 β -tubulin和rpb2a序列构建的单基因ML系统进化树的拓扑结构基本一致,而基于ITS序列的单基因系统进化树与前二者差异较大。

2.2.3 多基因系统进化树构建及分析

基于ITS、 β -tubulin和rpb2a三个基因联合序列构建了菌株DT2011N7的多基因ML系统进化树(图5),发现贵州绿僵菌*M. guizhouense*、金龟子绿僵菌大孢变种*M. majus*、金龟子绿僵菌*M. anisopliae*和蝗绿僵菌这4个种聚集于金龟子绿僵菌复合种分支,自展值为100;黄绿绿僵菌、低温绿僵菌*M. frigidum*、黄绿绿僵菌小孢变种*M. minus*和瘦绵蚜绿僵菌*M. pemphigi*这4个种聚集于黄绿绿僵菌复合种分支,自展值为100;柱孢绿僵菌*M. cylindrosporum*和绿色野村菌*M. viridulum*聚集于同一分支,自展值为100;菌株DT2011N7位于绿僵菌属下级分支,与莱氏绿僵菌聚集于同一分支,自展值为100。与单基因系统进化树相比,多基因系统进化树各分支节点大多高于80,自展值较单基因进化树中同一节点高,更能准确反映各菌株的亲缘关系及分类地位。

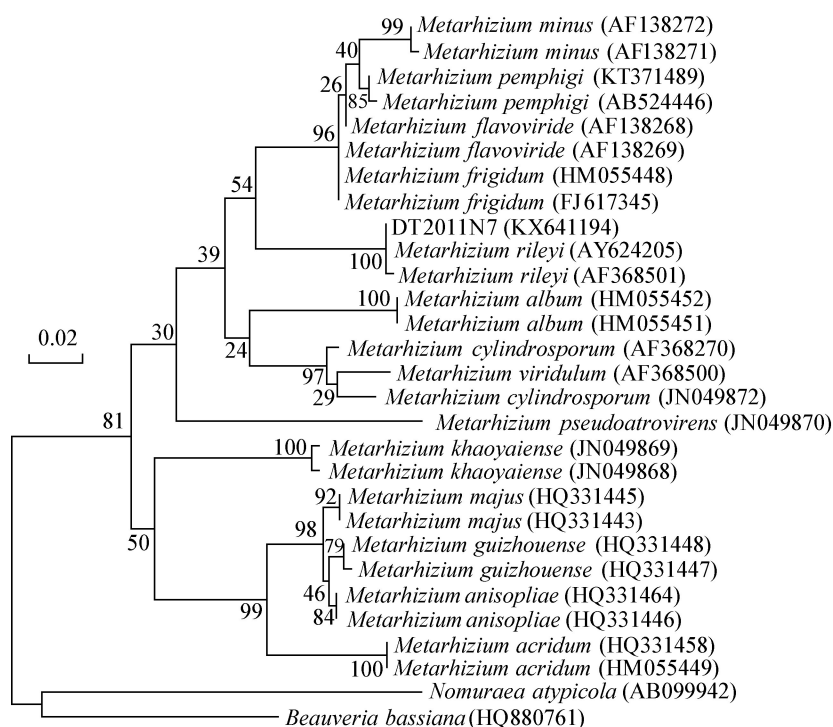


图2 基于ITS序列构建菌株DT2011N7及绿僵菌属其它相关菌株的ML系统进化树

Fig. 2 The ML phylogenetic tree of strain DT2011N7 and other related strains of *Metarhizium* based on ITS sequences

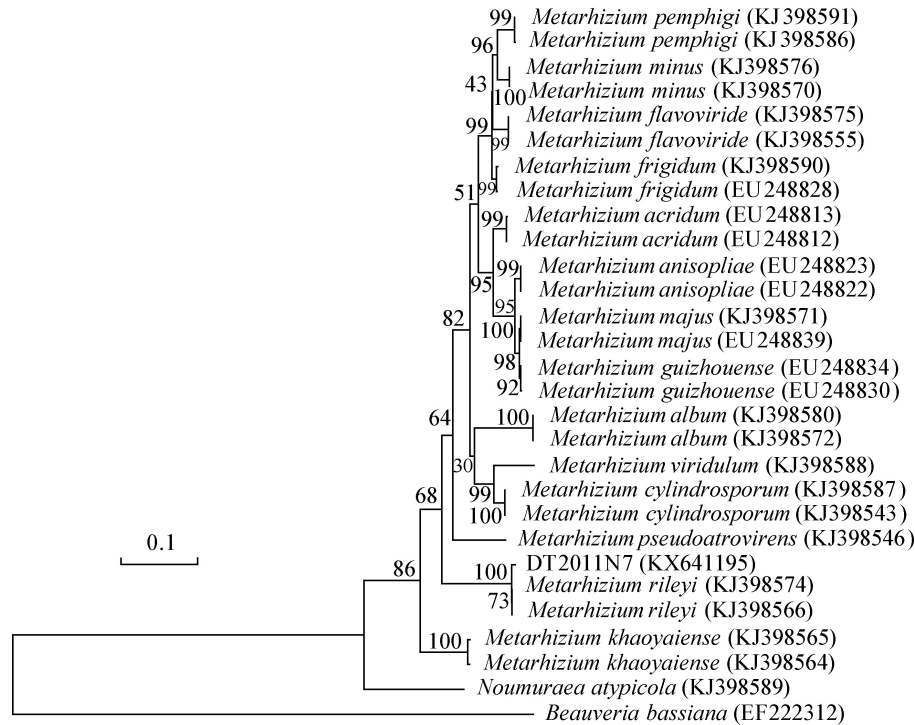


图3 基于 β -tubulin单基因序列构建菌株DT2011N7及绿僵菌属其它相关菌株的ML系统进化树

Fig. 3 The ML phylogenetic tree of strain DT2011N7 and other related strains of *Metarhizium* based on β -tubulin sequences

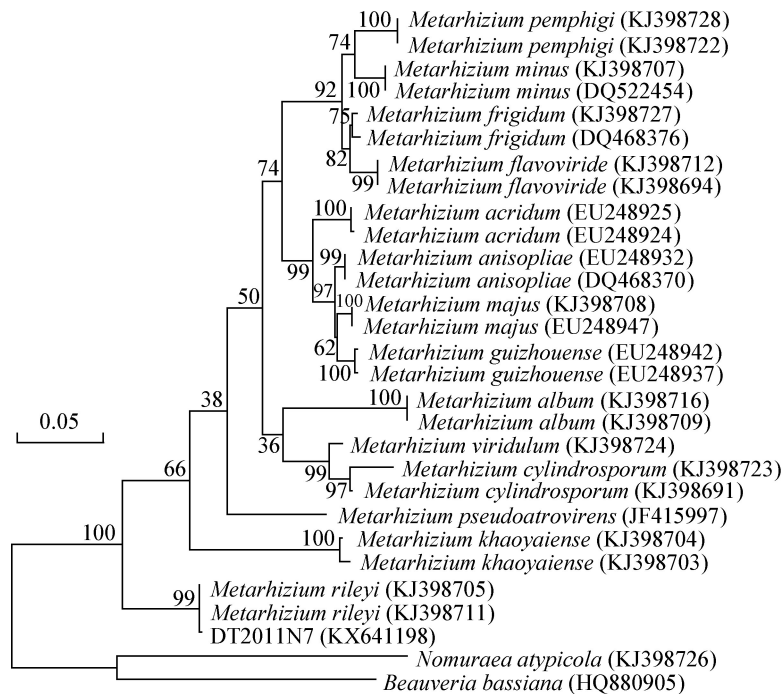


图4 基于rpb2a单基因序列构建菌株DT2011N7及绿僵菌属其它相关菌株的ML系统进化树

Fig. 4 The ML phylogenetic tree of strain DT2011N7 and other related strains of *Metarhizium* based on *rpb2a* sequences

3 讨论

本研究从上海辰山植物园草坪害虫淡剑灰翅夜蛾罹病虫体分离得到病原性菌株DT2011N7,采用

浸渍法回接至淡剑灰翅夜蛾幼虫证明其致病性,通过形态学观察、BLAST序列比对以及基于ITS、 β -tubulin和rpb2a的单基因和多基因序列联合分析,将菌株DT2011N7鉴定为莱氏绿僵菌*M. rileyi*。

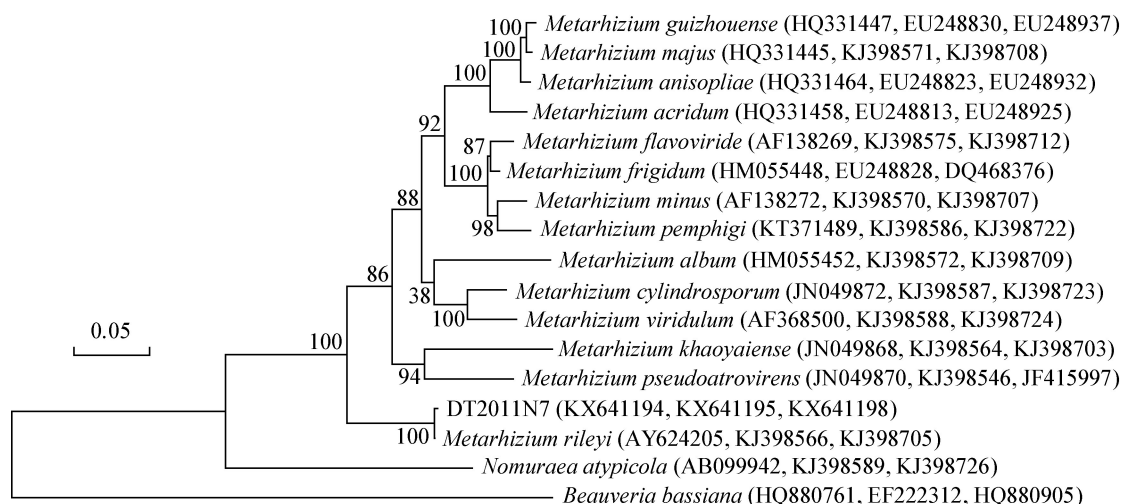


图5 基于ITS、 β -tubulin和rpb2a三基因序列构建菌株DT2011N7及绿僵菌属其它相关菌株的ML系统进化树

Fig. 5 The ML phylogenetic tree of strain DT2011N7 and other related strains of *Metarhizium* based on their ITS, β -tubulin and rpb2a sequences

括号内 GenBank 序列登录号依次对应 ITS 序列、 β -tubulin 和 rpb2a 基因序列。GenBank accession numbers from left to right in brackets respectively correspond to ITS, β -tubulin and rpb2a gene sequences.

莱氏绿僵菌是重要的虫生真菌,对该菌的分类地位经过多次变动后,至1974年定名为莱氏野村菌 *N. rileyi* (Samson, 1974),沿用至近年。黄勃等(2004)依据形态学和分子生物学证据将绿色野村菌 *Nomuraea viridula* 归入绿僵菌属 *Metarhizium*,并对莱氏野村菌 *N. rileyi* 的分类地位提出疑问,认为它和绿僵菌属亲缘关系较近,进而对野村菌属的存在提出质疑。Kepler et al. (2014) 基于多基因系统进化分析,结合绿僵菌属及相关近缘属种的形态学特征及寄主差异,提出大部分产绿色孢子的野村菌属中的种均应归至绿僵菌属,莱氏野村菌 *N. rileyi* 应归于绿僵菌属。本研究中,无论在单基因或多基因系统进化树中,菌株DT2011N7与莱氏绿僵菌均位于同一分支,表明其与莱氏绿僵菌为同一种,这与 Kepler et al. (2014) 的结果一致。虽然多基因系统进化树也显示莱氏绿僵菌位于绿僵菌属下而远离其它种的一个独立分支上,说明莱氏绿僵菌与绿僵菌属下其它种亲缘关系稍远;但其连同绿僵菌属下其它种均与野村菌属紫色野村菌 *Nomuraea atypicola* 位于不同的进化分支,遗传距离更远。这一结果支持了 Kepler et al. (2014) 将莱氏绿僵菌划归于绿僵菌属的结论。

陈月碧等(1983)将莱氏野村菌的形态诊断特征描述为:罹病虫体初期覆白色绒毛层,后逐渐变为嫩绿色或荷叶绿;分生孢子梗直立,分隔;瓶梗轮生,近圆锥形;分生孢子梨形,椭圆形至柱状,3.7~4.7 μm × 2.0~2.5 μm 。White et al. (2003) 描述为:菌落生长缓慢,分生孢子梗直立分隔;分生孢子单细胞,短瓶状。

本研究中菌株DT2011N7的形态特征与以上学者对莱氏野村菌的描述基本一致。吕思行等(2015)和钟万芳等(2015)采用了形态学特征结合ITS序列分析的方法对莱氏野村菌进行分类鉴定。然而,研究显示ITS序列有时不足以区分绿僵菌属内一些近缘种或复合种(王萌等,2014)。为了避免这种局限性,本研究另外引入了 β -tubulin和rpb2a基因序列,分别进行了BLAST同源比对,通过单基因及多基因联合序列分析能更准确地对供试菌株进行分类鉴定。

对菌株DT2011N7的3个基因序列分别进行BLAST同源比对,结果均显示其与莱氏绿僵菌具有最高的同源性,不同基因序列一致性均达99%~100%。然而,其与一些近缘种基因序列也有80%~95%的一致性,仅BLAST比对结果不足以支持对菌株的分类鉴定。因此,本研究基于ITS、 β -tubulin和rpb2a基因序列构建了绿僵菌属单基因ML系统进化树,发现菌株DT2011N7总是与莱氏绿僵菌聚于同一分支,与BLAST比对结果一致,表明其与莱氏绿僵菌遗传距离最近,同源性最高。但基于ITS和rpb2a序列构建的单基因系统进化树中有较多分支节点自展值不高,表明其不能有效区分这些分支,聚类结果存在不确定性。3个单基因系统进化树中,仅基于 β -tubulin基因序列构建的绿僵菌属ML系统进化树,大部分分支节点自展值高于60,准确度最高,可用于遗传进化分析。尽管如此,在3个单基因系统进化树中,同种真菌均能准确聚集在同一分支,自展值多在90以上;金龟子绿僵菌及黄绿绿僵菌2个

复合种下的真菌也均能正确聚类;柱孢绿僵菌 *M. cylindrosporum* 和绿色野村菌总聚在相邻分支,与 Kepler et al. (2014) 结果一致。这表明单基因 ML 系统进化树能对同种真菌或同类群真菌正确聚类,但由于其上级分支自展值不高,有时不足以明确该分支在整个进化树中的位置。尤以基于 ITS 序列构建的单基因 ML 系统进化树准确性较差,大量分支节点自展值低于 40;与基于 β -tubulin 和 *rpb2a* 序列构建的进化树拓扑结构也有明显差异,表明仅靠 ITS 序列对绿僵菌属进行系统进化分析有其局限性。Kiss (2012) 和 Schoch et al. (2012) 等也指出 ITS 在真菌分类时,有时提供的遗传信息有限。

基于多基因联合分析构建的系统进化树可克服上述缺点,显著提高进化树的分辨力和可信度 (Devulder et al., 2005)。如 Bischoff et al. (2009) 基于多基因联合完善了金龟子绿僵菌复合种的系统进化分析; Kepler et al. (2014) 联合多个基因构建了绿僵菌属及其相关属真菌的系统进化树,澄清了绿僵菌属及相近属的界定及一些绿僵菌属下种的分类问题。为弥补单基因系统进化树的不足,本研究基于 3 个基因联合构建了多基因系统进化树,结果显示多基因系统进化树中除个别节点外,自展值均超过了 80,较单基因进化树具有更高的可信度。整个系统进化树拓扑结构与 Kepler et al. (2014) 基于多基因进化分析对绿僵菌属及相关种真菌分类研究中构建的多基因系统进化树显示了高度一致性,也佐证了本研究中构建的多基因系统进化树是可信的。尽管 Kepler et al. (2014) 研究中多基因 ML 系统进化树中主要分支节点自展值均超过了 90,可信度更高,但这是由于其采用了包含 *BTUB*、*RPB1* (*RPB1a* 和 *RPB1b*)、*RPB2* (*RPB2a* 和 *RPB2b*)、*TEF* (*3P_TEF* 和 *5P_TEF*) 在内多达 7 个基因片段联合构建系统进化树,提供了更为详尽的遗传信息。

莱氏绿僵菌已被广泛报道可侵染多种鳞翅目夜蛾科幼虫,如斜纹夜蛾、甜菜夜蛾等,但侵染草坪害虫淡剑灰翅夜蛾在我国为首次报道。此前,仅 Zhang & Shimazu (1999) 有报道日本曾从此虫上分离到 1 株莱氏绿僵菌。虫生真菌虽具有较广的寄主谱,但也有一定的专化性 (樊美珍等, 1986; 蔡国贵, 2003), 因此针对不同靶标害虫,筛选毒力较高的莱氏绿僵菌专化性菌株十分重要。本研究结果为今后开展草坪重要害虫淡剑灰翅夜蛾的生防菌株筛选提供了候选材料。

参 考 文 献 (References)

Ambethgar V. 2009. Potential of entomopathogenic fungi in insecticide

resistance management (IRM): a review. *Journal of Biopesticides*, 2(2): 177–193

Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA. 2006. *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. *Mycologia*, 98(5): 737–745

Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4): 512–530

Cai GG. 2003. Screening of the superior strains of *Beauveria bassiana* of *Pantana phyllostachysae* and practical application. *Scientia Silvae Sinicae*, 39(2): 102–108 (in Chinese) [蔡国贵. 2003. 刚竹毒蛾白僵菌优良菌株筛选及生产应用研究. *林业科学*, 39(2): 102–108]

Chen YB, Liang ZQ, Liu AY. 1983. Study on isolation, identification and utilization of *Nomuraea rileyi*. *Guizhou Agricultural Sciences*, (3): 60–62 (in Chinese) [陈月碧, 梁宗琦, 刘爱英. 1983. 莱氏野村菌的分离、鉴定和利用研究. *贵州农业科学*, (3): 60–62]

Chen YX. 1999. *Fauna sinica: Insecta*, Vol. 16: Lepidoptera, Noctuidae. Beijing: Science Press, pp. 740–741 (in Chinese) [陈一心. 1999. 中国动物志: 昆虫纲, 第 16 卷: 鳞翅目夜蛾科. 北京: 科学出版社, pp. 740–741]

de Faria MR, Wraight SP. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3): 237–256

Devulder G, de Montclos MP, Flandrois JP. 2005. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1): 293–302

Fan MZ, Guo C, Zhang B. 1986. Comparison of the infectivity of *Beauveria bassiana* to four species of stem boring insects. *Chinese Journal of Biological Control*, 2(3): 126–128 (in Chinese) [樊美珍, 郭超, 张波. 1986. 四株球孢白僵菌菌系的初步研究. *生物防治通报*, 2(3): 126–128]

Gu BL, Sun XQ, Qian J, Pei F, Ye LH, Gu GL, Lu ZX. 2007. Studies on the occurrence and control of *Sidemia depravata* Butler in Shanghai. *Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences)*, 36(1): 79–82 (in Chinese) [顾保龙, 孙兴全, 钱进, 裴峰, 叶黎红, 顾国林, 陆志兴. 2007. 上海地区淡剑夜蛾发生规律及其防治. *上海师范大学学报(自然科学版)*, 36(1): 79–82]

Guo PL, Zhang DL, Zhang SP. 1993. Observation on the biological characters of *Sidemia depravata* (Butler). *Entomological Knowledge*, 30(2): 103–106 (in Chinese) [郭佩联, 张德林, 张淑萍. 1993. 淡剑夜蛾生物学特性观察. *昆虫知识*, 30(2): 103–106]

Huang B, Li SG, Li CR, Fan MZ, Li ZZ. 2004. Studies on the taxonomic status of *Metarhizium cylindrospora* and *Nomuraea viridula*. *Mycosystema*, 23(1): 33–37 (in Chinese) [黄勃, 李世贵, 李春如, 樊美珍, 李增智. 2004. 柱孢绿僵菌和绿色野村菌分类地位的研究. *菌物学报*, 23(1): 33–37]

Ignoffo CM, Puttler B, Hostetter DL, Dickerson WA. 1976. Susceptibility of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, to several isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 28(2): 259–262

Iwano H. 1987. Seasonal occurrence of microsporidia in the field popu-

- lations of the lawn grass cutworm, *Spodoptera depravata* Butler. Japanese Journal of Applied Entomology & Zoology, 31(4): 321–327 (in Japanese)
- Kang YJ, Lee DW, Choo HY, Lee SM, Kweon TW, Shin HK. 2004. Biological control of *Spodoptera depravata* (Butler) (Lepidoptera: Noctuidae) using entomopathogenic nematodes. Korean Journal of Applied Entomology, 43(1): 61–70 (in Korean)
- Kepler RM, Humber RA, Bischoff JF, Rehner SA. 2014. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. Mycologia, 106(4): 811–829
- Kiss L. 2012. Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences as species barcodes for fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(27): e1811
- Li ZZ, Alves SB, Roberts DW, Fan MZ, Delalibera I Jr., Tang J, Lopes RB, Faria M, Rangel DE. 2010. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. Biocontrol Science and Technology, 20(1/2): 117–136
- Lü SX, Zheng CG, Jiang MH, Xu SL, Yang SJ, Tang L, Liu JP. 2015. Isolation and identification of *Nomuraea rileyi*, an entomopathogenic fungus. Guangdong Agricultural Sciences, 42(15): 53–56 (in Chinese) [吕思行, 郑常格, 江敏华, 徐树兰, 杨思佳, 汤历, 刘吉平. 2015. 一株昆虫病原性真菌莱氏野村菌的分离与鉴定. 广东农业科学, 42(15): 53–56]
- Luo QQ, Xu Y, Liu M. 2012. Identification of the pathogen causing trunk canker of *Cornus alba*. Plant Protection, 38(4): 115–117 (in Chinese) [罗卿权, 徐颖, 刘美. 2012. 红端木溃疡病原菌的鉴定. 植物保护, 38(4): 115–117]
- Moriwaki J, Tsukiboshi T, Sato T. 2002. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. Journal of General Plant Pathology, 68(4): 307–320
- Nicholson P, Parry DW. 1996. Development and use of a PCR assay to detect *Rhizoctonia cerealis*, the cause of sharp eyespot in wheat. Plant Pathology, 45(5): 872–883
- Nong XQ, Zhang YC, Wang YY. 2015. Advances in registration and formulation techniques of *Metarhizium* biological insecticides. Journal of Plant Protection, 42(5): 702–714 (in Chinese) [农向群, 张英财, 王以燕. 2015. 国内外杀虫绿僵菌制剂的登记现状与剂型技术进展. 植物保护学报, 42(5): 702–714]
- Perinotto WMS, Terra ALM, Angelo IC, Fernandes ÉKK, Golo PS, Camargo MG, Bittencourt VREP. 2012. *Nomuraea rileyi* as biological control agents of *Rhipicephalus microplus* tick. Parasitology research, 111(4): 1743–1748
- Samson RA. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. Studies in Mycology, 6: 1–119
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(16): 6241–6246
- Song YS, Huang BY. 2006. Market analysis and countermeasures of *Beauveria bassiana* in China. World Forestry Research, 19(6): 53–57 (in Chinese) [宋玉双, 黄北英. 2006. 我国白僵菌市场分析及对策. 世界林业研究, 19(6): 53–57]
- Srisukchayakul P, Wiwat C, Pantuwatana S. 2005. Studies on the pathogenesis of the local isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura*. Science Asia, 31: 273–276
- Tu Z. 2006. Study on *Nomuraea rileyi* cq strain (Nr-cq0310) from silkworm in Chongqing China. Master Thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [涂增. 2006. 莱氏野村菌(*Nomuraea rileyi*) cq菌株(Nr-cq0310)的研究. 硕士学位论文毕业论文. 重庆: 西南大学]
- Wang M, Yin YP, Wang ZK, Liu JJ, Liao YF. 2014. Multilocus phylogenetic analysis of the taxonomic status of 10 strains of *Metarhizium*. Plant Protection, 40(5): 14–21 (in Chinese) [王萌, 殷幼平, 王中康, 刘娟娟, 廖玉凤. 2014. 10株绿僵菌菌株分类地位的多基因系统进化分析. 植物保护, 40(5): 14–21]
- Wang RZ, Pan LL, Yan JJ. 2007. Studies on the control techniques of lawn pest: *Sidemia depravata*. Journal of Liaoning Agricultural College, 9(3): 27–28 (in Chinese) [王润珍, 潘丽丽, 闫俊俊. 2007. 草坪害虫—淡剑夜蛾防治技术研究. 辽宁农业职业技术学院学报, 9(3): 27–28]
- Weir BS, Johnston PR, Damm U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Studies in Mycology, 73: 115–180
- White JF Jr., Bacon CW, Hywel-Jones NL, Spatafora JW. 2003. Clavicipitalean fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol and cultural impacts. Boca Raton: CRC Press, pp. 97–113
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, pp. 315–322
- Xue M, Kang JS, Yu X, Wang JF. 2002. Study on biology and control techniques of lawn pest *Sidemia depravata* Butler. Entomological Journal of East China, 11(1): 68–72 (in Chinese) [薛明, 康俊水, 于晓, 王建方. 2002. 草坪害虫淡剑夜蛾生物学及防治技术的研究. 华东昆虫学报, 11(1): 68–72]
- Yan CX, Qiao JG, Xu MH, Cui ZK. 1999. A study on bionomics of *Sidemia depravata*, a pest of cold season lawn. Hebei Journal of Forestry & Orchard Research, 14(4): 358–361 (in Chinese) [严彩霞, 乔建国, 徐茂华, 崔征凯. 1999. 冷季型草坪害虫——淡剑夜蛾生物学特性研究. 河北林果研究, 14(4): 358–361]
- Zhang B, Shimazu M. 1999. Virulence experiments of two strains of *Nomuraea rileyi* on larvae of *Spodoptera litura* Fabricius. Forest Studies in China, 1(2): 77–79
- Zhong WF, Li XP, Guo HF. 2015. Screening of a *Nomuraea rileyi* strain with high insecticidal activity against *Spodoptera exigua*. Journal of Environmental Entomology, 37(4): 910–914 (in Chinese) [钟万芳, 李雪萍, 郭慧芳. 2015. 一株高效防治甜菜夜蛾的莱氏野村菌的筛选. 环境昆虫学报, 37(4): 910–914]
- Zhou MS, Xie Y, Zhang CH, Chen HY, Wang Q, Wang YL, Bao YZ. 2000. Study on oviposition and occurrence forecast of *Sidemia depravata*. Journal of Anhui Agricultural University, 27(4): 364–367 (in Chinese) [周明善, 谢勇, 张朝辉, 陈韩英, 王强, 汪云龙, 包育志. 2000. 淡剑夜蛾产卵量与发生期的预测预报. 安徽农业大学学报, 27(4): 364–367]

(责任编辑:李美娟)